

た。1月8日初発の患者が3階にみられた後12日までは数人の発生であったが、14日には全階に広がり12名と急増し職員の発症者もみられた。15日に保健所に通報があり、拡大防止のための衛生指導を行ったがその後も患者は増え18日まで続いた。長期間続いた事例の患者発生は、いずれも事例4のようにピークがなだらかで、ピークの数日前から患者がみられるパターンを示し、人一人感染による集団発生であることが推定された。事例4のウイルス検査の結果、表4に示したように、発症日が患者発生のピーク前の12日から最後の患者発生の18日までの11検体から(1検体は職員)NVが検出されいずれも塩基配列が一致した。

事例6は1月13日をピークとした一峰性で一斉暴露を受けたと思われるが、推定原因食である給食を喫食したデイサービス利用者に発症者がみられず原因不明となった(図4)。無症状の調理員からNVを検出し患者由来株と塩基配列が一致した。

D. 考察

NVは冬季を中心として食中毒や様々な施設での感染性胃腸炎の集団発生の原因となっており、衛生行政上の重要な問題となっている。

今回の結果から、老人保健施設や保育所など介護を伴う施設では、なんらかの原因でNV患者が発生すると人一人感染により感染が拡大する可能性が高く、ウイルス感染を制御する事が難しく長期化しやすいことが示され

た。

人一人感染は糞口感染と空気感染(吐物が空気中に飛散しエアロゾルになる)によって起こると考えられる。今回の事例でも、保育所では屋内の遊戯室で園児が嘔吐した後患者発生し、糞口感染だけでなく乾燥した吐物が飛散し次ぎの感染を生じる可能性も推測された。施設内でNVを拡大させないための対策は、汚物によって汚染された環境の消毒、患者に接触したときの手洗いを徹底するなどの衛生管理が重要であると考えられる。

E. まとめ

1. 2003年4月から2004年1月までに千葉県内でNV集団発生事例が19事例あった。発生場所は、社会福祉施設、保育所、学校、病院など集団生活の場での発生が13事例(62%)と多かった。

2. 検出したNVはGIが3事例、GIIが15事例GI・GII混合は1事例であった。遺伝子型はGIの遺伝子型はShindlesham、SOV、Norwalk、GIIの遺伝子型はLV、MXV、Leeds、Miamiであった。12月までは様々な遺伝子型が検出されたが1月は全てLVによるものであった。

3. 社会福祉施設、保育所での集団発生事例8事例についてその感染経路を検討したところ、1事例は食中毒を疑う事例であったが、7事例は疫学調査とウイルス検査から、人一人感染による集団発生であることが推定された。

参考文献

- 1) 齊藤博之ら：老人保健施設内で集団発生した小型球形ウイルス感染症に関する調査報告、病原微生物検出情報、Vol. 20 No. 11, 1999
- 2) 和佐野ちなみら：市内社会福祉施設におけるNLV集団感染事例と有症者入院先の病院におけるNLV集団感染事例、病原微生物検出情報、Vol. 23 No. 5、2002

表1. NV集団発生事例の発生場所と感染経路

発生場所	食中毒	人一人感染	不明	計
社会福祉施設		5	1	6
病院		1		1
学校		2	1	3
保育所		3		3
飲食店	4			4
事業所	1			1
旅館	1			1
計	6	11	2	19

図1. NV事例月別発生状況

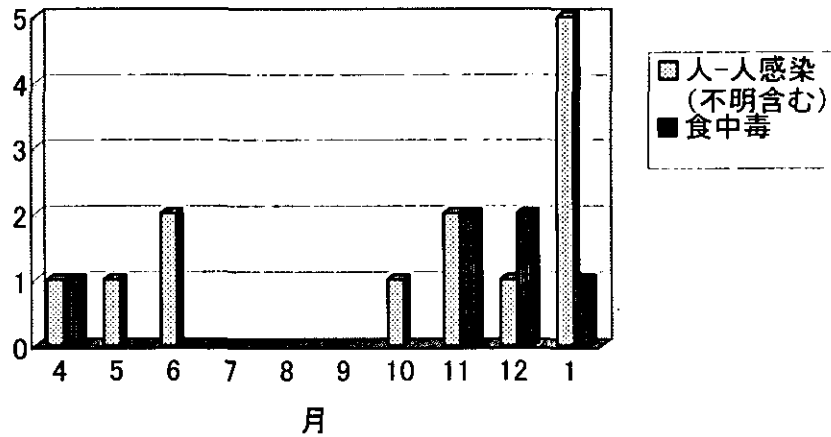


図2. NV事例の月別遺伝子型発生状況

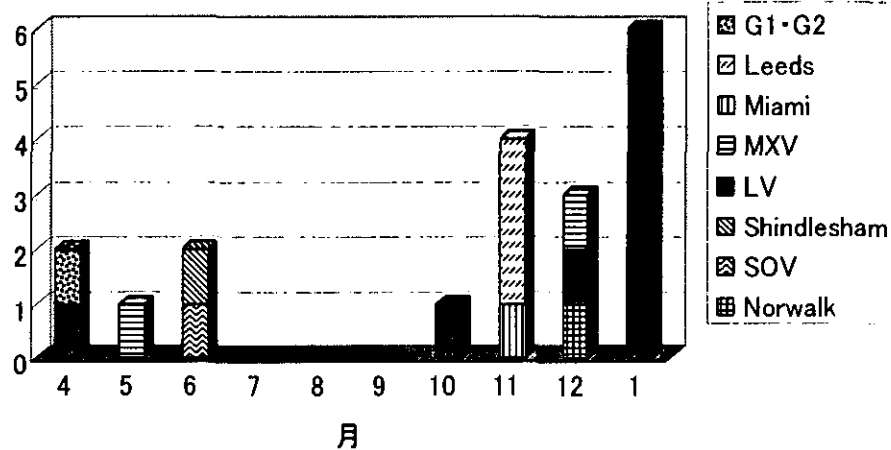


表2. 施設における集団発生の概要

事例 No.	発生年月日	発生期間	発生場所	発病率 (%)
1	H15. 5.17	14日	保育所	園児 39/70 (56) 職員 6/不明
2	H15.10.16	7日	老人保健施設	入所者18/56 (32) 職員 11/不明
3	H15.11.17	15日	保育所	園児 56/115 (49)
4	H16. 1. 8	11日	老人保健施設	入所者46/66 (70) 職員 6/60 (10)
5	H16. 1. 9	16日	老人保健施設	入所者41/60 (68) 職員 5/60 (8)
6	H16. 1.12	4日	身体障害者施設	園生 19/48 (40) 職員 3/45 (7)
7	H16. 1.13	13日	精神障害者施設	園生 39/62 (63) 職員 3/10 (30)
8	H16. 1.16	13日	老人保健施設	入所者25/96 (26) 職員 10/90 (11)

表3. 施設における集団発生のウイルス検査結果

事例 No.	検体数	EM陽性数	RT-PCR 陽性数	遺伝子型
1	11	5	6	MXV
2	7	6	7	LV
3	3	1	3	Leeds
4	12	5	11	LV
5	7	3	5	LV
6	10	5	10	LV
7	7	3	7	LV
8	5	3	4	LV

図3. 事例4の患者発生状況

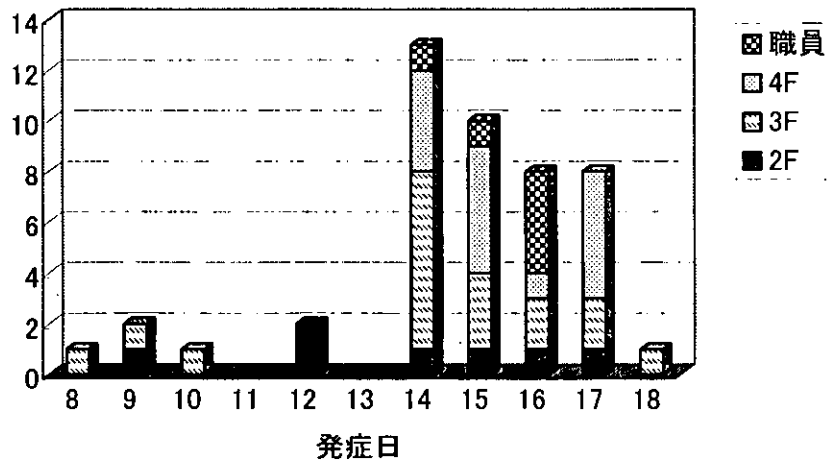
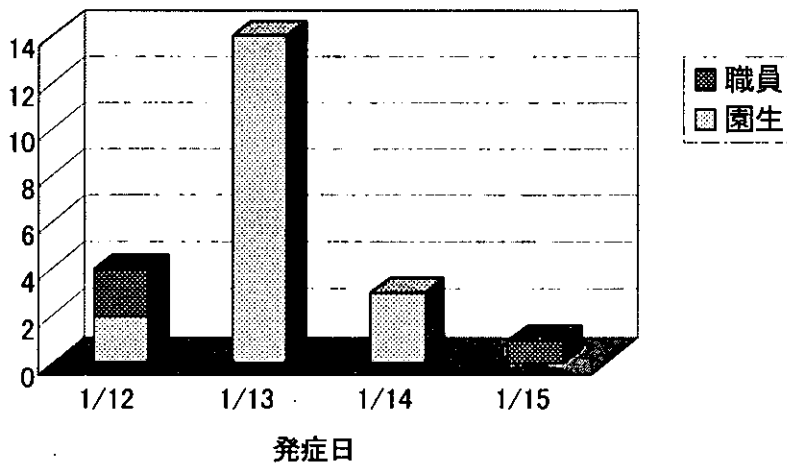


表4. 事例4の発症日別NV検出結果

発症日	1月12日	1月14日	1月15日	1月18日
NV(+)	1	7 (1)*	2	1
NV(-)			1	

* ()は職員の陽性数

図4. 事例6の患者発生状況



厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

分担研究者 齋藤博之 秋田県衛生科学研究所主任研究員

研究要旨 食中毒の主要な原因病原体であり、それ以外にも多様な感染ルートをもつノロウイルスの集団発生局面において、行政判断に役立つ情報を早期に把握するためにSSCP解析の導入を検討した。最大50検体の遺伝子の異同を1日半で比較できるため大規模で複雑な事例であっても十分に対応できるものと考えられた。

研究協力者

東方美保 福井県衛生環境研究センター

飯塚節子 島根県保健環境科学研究所

山本保男 徳島県保健環境センター

A. 研究目的

食品由来ウイルスの中でもノロウイルス(NV)による健康被害は、食中毒だけを例にとっても原因病原体(細菌も含む)の3分の1を占めており、2001～2002年は首位となっている。さらに、NVの感染ルートは食品媒介以外にも地域流行や人から人への感染、施設汚染による集団発生など複数が存在する。かつては、NVによる胃腸炎は生カキの汚染による食中毒が主流であったが、最近の流行事例の特徴として老人施設・障害者施設・学校等での人から人への感染が急増しており、大規模化、広域化、複雑化の一途をたどっている。NVの検査体制としてはすでにRT-PCR法が全国的に普及しているため飲食店等での単純な食中毒事例ならば行政上の対応に不備をきたすことは少ない。しかし、人から人への感染を伴ったり、複数の自治体や施設にまたがって患者が発生したりするような複雑なケースでは、流行の全体像を把握するためにPCR増幅産物の塩

基配列を比較する手法が必要となってくる。一般には塩基配列の比較とはシークエンスの決定を意味しており時間をかけて疫学的データを蓄積して将来の対策に生かすという観点から語られることが多い。一方で、何らかの事例が発生して行政上の対応が必要となる局面では迅速性が必要となり、シークエンスの決定は時間軸が異なるため有効な手法にはなりにくい。特に遺伝子解析が必要となるようなケースでは検体数そのものが膨大となることが想定されるため、多数のPCR増幅産物の塩基配列の異同をシークエンスの決定作業無しに判定できるような手法を取り入れることが望ましい。本研究では1塩基の違いでも鋭敏にパターンが変動し、異同判定に有効と考えられる一本鎖高次構造多型解析(Single Strand Conformation Polymorphism: SSCP解析)を用いることで流行局面での行政対応に有用な情報を提供できるようにすることを目的としている。

B. 研究方法

SSCP 解析の特徴の一つとして、増幅産物のサイズが 100～400bps 程度であればどのようなプライマーを使用してもよいため、現時点で広く使われているプライマーについて 5'末端をビオチンでラベルしたものを準備した。糞便等の検体処理と RT-PCR の手順については、ビオチン化プライマーを用いる他は平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」に準拠した。SSCP 解析の手順を図 1 に示した。アガロース電気泳動で所定のバンドを確認した後、PCR チューブの底に残った増幅産物を SSCP

Buffer (95%フォルムアミド - 0.25%ブロムフェノールブルー - 0.25%キシレンシアノール) で 100 倍に希釈して 90°C で 2 分熱変性した後、SSCP ゲル(4%アクリルアミド - 5%グリセロール - 1×TBE) にアプライし、ゲル温度を 24°C に保ちながら 4 時間泳動した。この際の電気泳動装置は ATTO 社製「ジェノケンサーSSCP」を用いた。電気泳動終了後、ゲル中の PCR 産物をナイロン膜へサザンブロットの要領で転写(オーバーナイト)し、東洋紡社製ビオチン化学発光検出キット「Imaging high chemilumi」を用いて SSCP パターンを検出した。材料としては平成 15 年度に発生した集団感染事例の糞便を用いた。

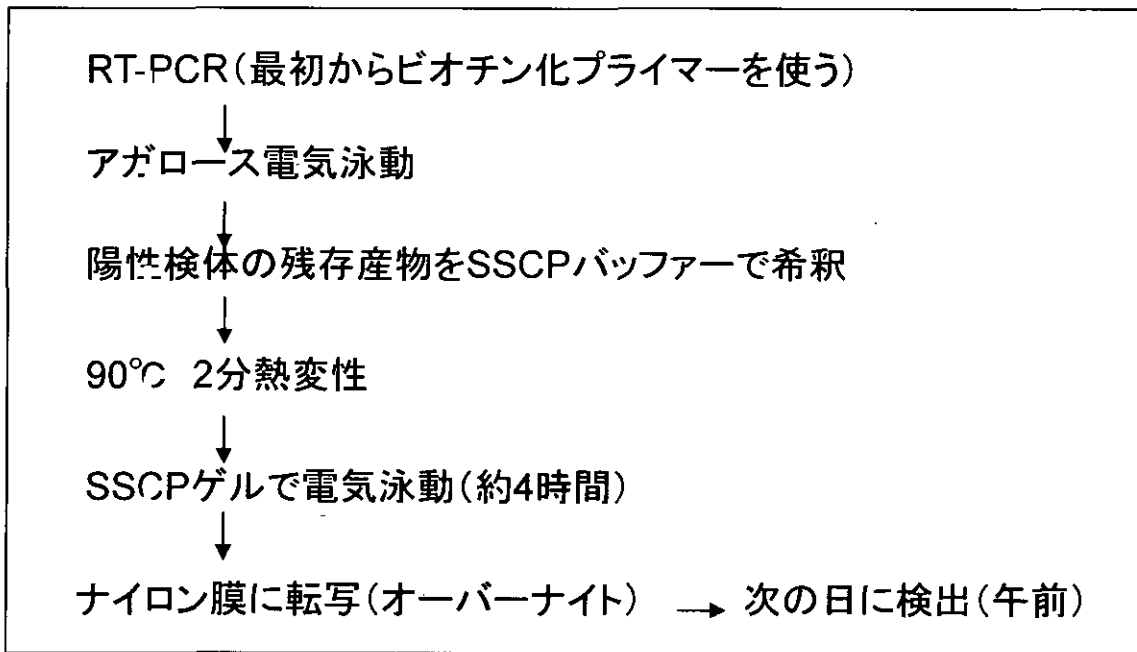


図1 SSCP 解析の手順

C. 研究結果

図 2 には一般的な飲食店における食中毒で、患者と調理従事者の双方から NV が検出された事例を示した。このような単純なケースであっても双方の塩基配列が同じであるという判定

を約 1 日半で下すことができるため、行政上の判断材料として有益な情報を提供することができた。図 3 と図 4 はいずれも複数の学校の運動部が合同合宿を行い、解散して各地元に帰還した後で発症した事例である。それぞれ別

の保健所から持ち込まれた検体ではあったが、SSCP パターンが同一であったことから感染源が同じであることが推測できるデータである。図 5 に示したのは、保育園で NV の流行が起こり、通園していた子供の家族も発症した事例である。保育園では 2 種類の NV が流行していて、そのうち的一方が子供から家庭内へと感染が広がったものと考えられる。図 6 は老人保健施設と近隣の高校での集団感染が同時に発生し両者の関係が懸念されたケースであったが、施設側の 3 種類の NV はいずれも高校側とは異なり、独立した事例と判断された。



図 2 飲食店における食中毒の一例

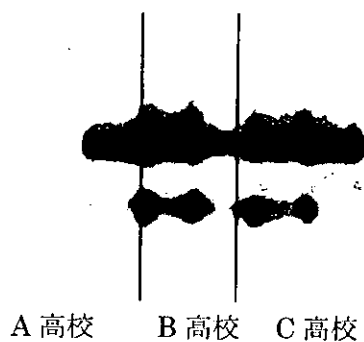


図 3 複数の学校の合同合宿の一例

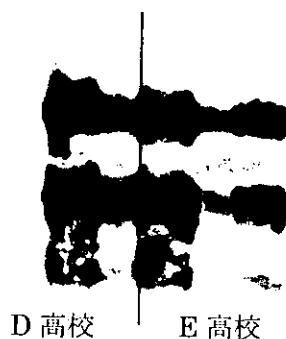


図 4 複数の学校の合同合宿の一例

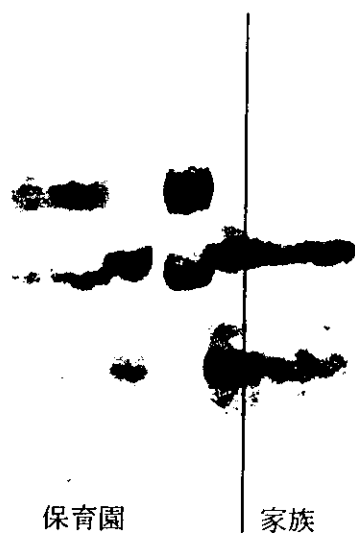


図 5 保育園での集団発生と家族内感染

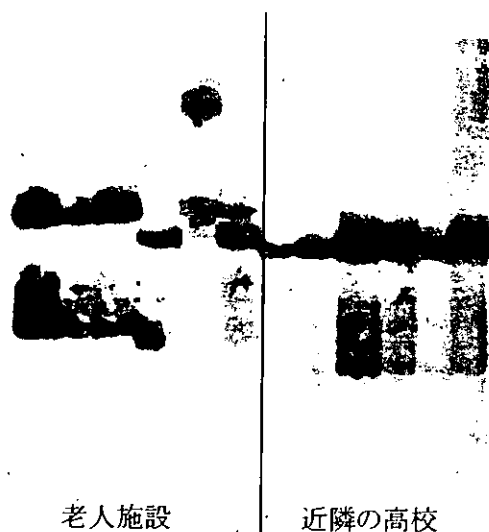


図 6 老人施設と学校での同時集団発生



図 7 院内感染の一例

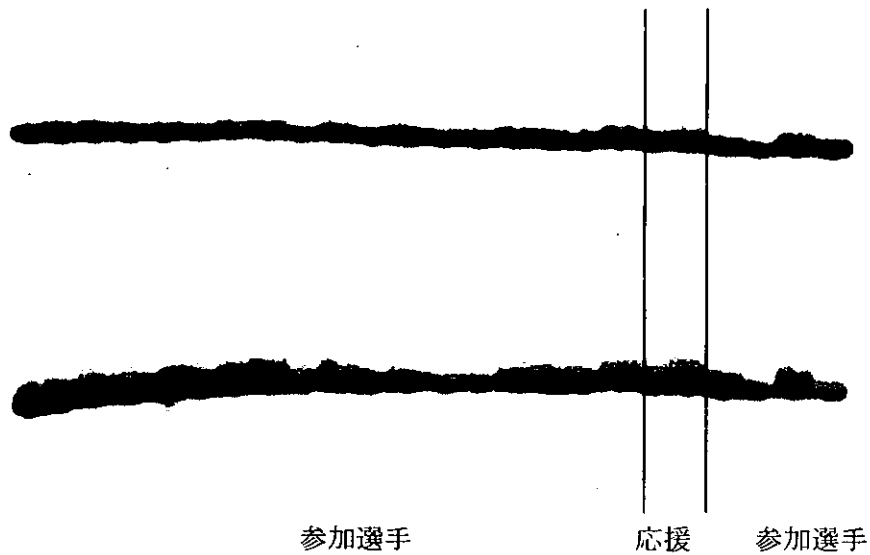


図 8 全国剣道大会での大規模事例

図 7 は病棟における院内感染の事例で 16 検体から NV が検出されたが、同一の SSCP パターンを示す NV が 13 検体と 3 検体のグループに別れたものの感染が裏付けられた。図 8 は高校剣道の全国大会で発生した大規模事例で、約 1000 人の参加者のうち 363 人が発症し、さらに応援に来ていた小学生や取材に来た新聞記者まで感染が広がり、結局大会は

中止に追い込まれた。このように大規模な事例であったため、保健所や患者を収容した病院などから複数のルートで大量の検体が持ち込まれ、その多くから NV が検出されたが SSCP 解析によって全て同じ塩基配列を持つウイルスであることが早期 (RT-PCR で検出から 1 日半後) に把握できた。

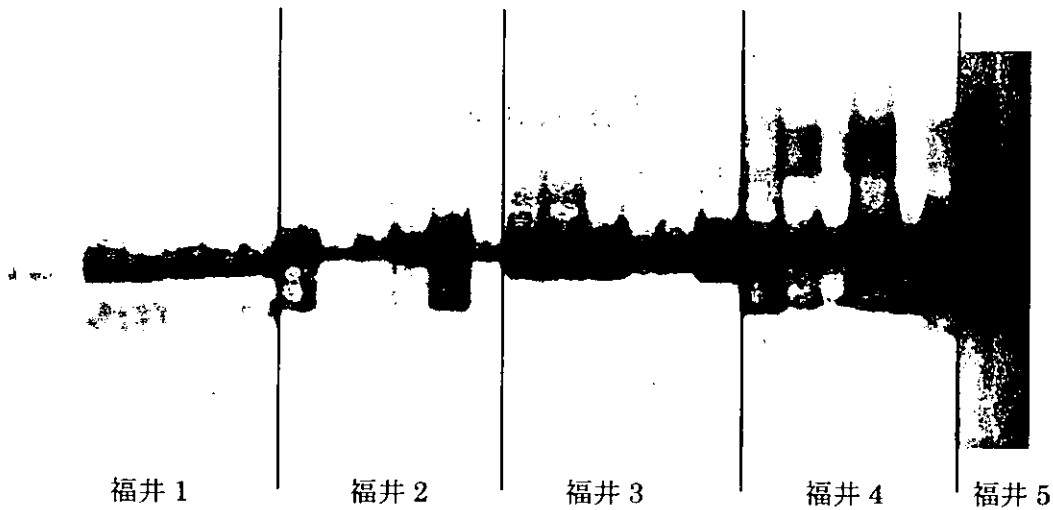


図 9 福井県における SSCP 解析を活用した 5 事例

SSCP 解析は流行局面での感染の全体像を迅速に把握するのが目的であるから、PCR 産物を外部に送付するよりも地元で直ちに行うのが望ましい。また、簡便ではあるものの独特の手技が含まれるため、普及を推進する意味で秋田以外の 3 地研においても実際の流行事例における有用性を検討した。図 9 は平成 15

年度に福井県で発生した NV の食中毒と集団感染 5 事例で、事例 1 と 3 が食中毒(カキは含まれない)、事例 2 と 4 が老人施設、事例 5 が学校における集団感染事例である。同一の事例では同じ SSCP パターンが認められているのがわかる。事例 3 の写真には患者の他に調理従事者 1 名も含まれている。

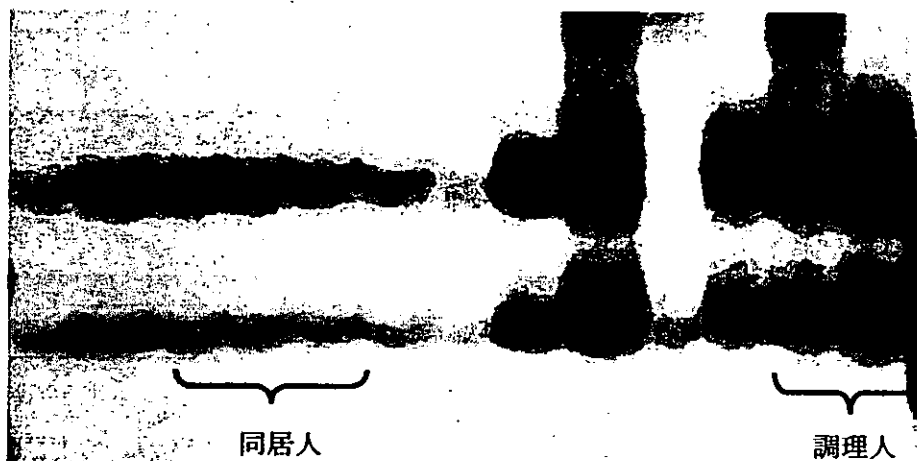


図 10 島根県における SSCP 解析を活用した事例

図 10 は島根県における食中毒事例で、飲食店で食事をした 2 つの高校のグループが発症した。そのうち一方には寮に住む学生も含ま

れていて同居人にまで 2 次感染が広がった。飲食店の調理人からも NV が検出されて、それらの SSCP パターンは同一であった。

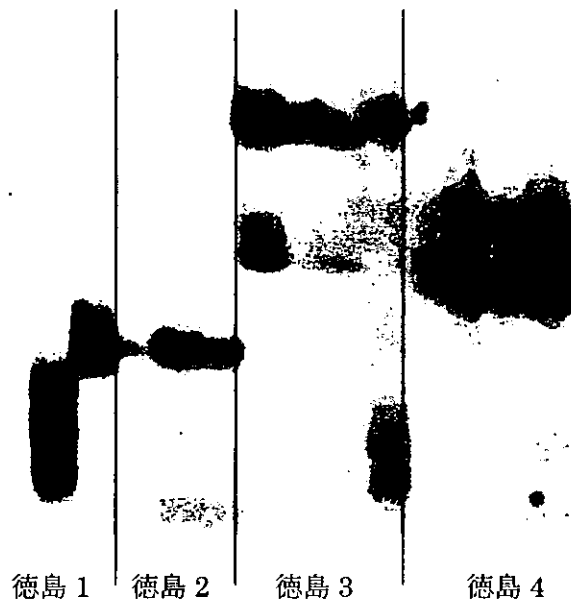


図 11 徳島県における SSCP 解析を活用した 4 事例

図 11 は徳島県における食中毒 4 事例で、事例 1 は生かき、事例 2 は学校での調理実習、事例 3 と 4 は飲食店で調理人(それぞれ左端のレーン)から感染したケースである。事例 1 の生かきによる食中毒では同一事例でも SSCP パターンは多様になることがすでに判明している。

D. 考察

本研究では NV の流行局面、あるいは集団感染などの危機管理局面において行政対応に直接役立つ情報を素早く把握する手法として SSCP 解析を検討した。前述のとおり NV は食品媒介のみならず人から人への 2 次感染や施設汚染による健康被害も引き起こすため、大規模化、広域化、複雑化が最近の流行事例から見たキーワードになっている。このような事例が発生した場合、RT-PCR 等によるウイルス検出のための検査は当然のごとく行われるが、行政対応のためにより精密な情報が求められるようなケースでは検出されたウイルスの遺伝子の異同が重要な判断材料となってくる。しか

しながら、全ての PCR 産物のシーケンスを決定して比較する方法は数週間～数ヶ月を要するため行政側との時間軸のずれが大きく、個々の局面で有効な情報を提供するという目的には向いていない。遺伝子解析が必要となるような事例は検体数も多いのが普通であるから、行政対応に役立てるためには多くの NV の遺伝子の異同をシーケンスせずに短期間に比較する手法の導入が必要になる。SSCP 解析は通常の RT-PCR による検査を行った後の残った PCR 産物を専用のバッファーで希釈して熱変性するだけの簡単な処理で済むため、その後の電気泳動とパターンの検出まで 1 日半で終了する。また、50 検体を同時に比較できるため大規模事例であっても十分に対応可能である。塩基配列そのものを知ることはできないが、行政判断で重要なのは複数の NV 遺伝子が「同じかどうか」であり、その情報を迅速に把握する手法として SSCP 解析を用いることは意義があるものと考えられた。本研究では平成 15 年度に発生した大小さまざまな事例について SSCP 解析を用いたが、最大の特徴は迅

速な情報把握であるため検体をどこかに送って解析してもらうといったレファレンスセンター的な方法では価値が損なわれる。むしろ、簡便であることに着目して各地元で導入することが望ましく、普及・推進の一環として3つの地研に対してSSCP解析のための重要なポイントを伝達して実際の事例で試してもらった。SSCP解析は実地で研修を行えば習得は容易であるが、独特の手技が含まれるため文章によるマニュアル作成には限界があり、動画も駆使したビデオマニュアル等の活用も今後の課題である。また、SSCP解析はNVに限らずPCR可能なものならば何にでも用いることができるため、今後の流行次第では他のウイルスにも適用範囲を広げていける可能性が残っている。

E. 結論

本研究で検討したSSCP解析は最大50検体のPCR産物の遺伝子配列の異同を1日半で比較することができるため、集団感染等の危機管理局面での行政判断に必要な情報の早期把握に役立つものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

食品由来下痢症ウイルスの分子疫学に関する研究

熊本市環境総合研究所

分担研究者 松岡由美子
研究協力者 新屋 拓郎

研究要旨；熊本市域に流通している地カキ、うば貝からノロウイルス(NV)、サポウイルス(SV)の検出をおこなった。その結果、地カキ 17 検体中 3 検体から、うば貝 12 検体中 4 検体から NV が検出された。SV は検出されなかった。検出された NV と、平成 15 年 12 月～16 年 2 月までに下痢症患者から分離された NV の遺伝子解析をおこない、両者を比較したところ地カキ、ウバ貝から検出された NV 遺伝子型と下痢症患者から検出された遺伝子型は一部 G II / 1、G II / 2 については一致したが、2 枚貝からはその他にも G I / 1、G I / 7 型など遺伝子型の違う NV が検出された。このことから熊本市域では多くの型のウイルスが流行していると考えられた。また、検出パターンの違いは、貝と人の検体数の差なのか、感受性の差なのか今後の調査で解明されると考えられた。

A 研究目的

下痢症ウイルスは、冬季に主に流行する食中毒若しくは、人→人感染をするウイルスである。NV 食中毒は 2 枚貝を原因食とするものが従来多かったが、近年は人→食品→人型の食中毒も多く、その際の食品はサラダ、弁当、パン等バラエティーに富んでいる。また、人→人感染で起こる集団発生もあり、食中毒との区別がつきにくくなっている。これらの原因となる NV、SV と環境中と人の間を行き来していることがわかっており、ウイルスのリザーバーを 2 枚貝がしていることも解っている。これらのことから、人里に近い地域から産出される 2 枚貝が、地域のウイルス流行を反映していると考えられる。このことから熊本市域で流行している下痢症ウイルスの疫学調査を目的として、患者、貝の両面から調査を行った。

B 研究方法

下痢症ウイルスの検出は、2 枚貝と、熊本市内で発生した苦情事例の下痢症患者便を対象とした。2 枚貝は、地カキ、ウバ貝をもちいた。地カキは、熊本市近海の海岸沿いで採取される天然の真ガキである。岩に付着して生育している状態であり、その身は養殖したものとは比べるとかなり小ぶりである。ウバ貝は、通称北寄貝であり、大きさはやはり小ぶりである。これらの貝は、生食用ではないが、熊本市内の魚屋で刺身のコーナーに置かれていることもあることから今回検体として選んだ。

貝は、平成 15 年 2 月に地カキ 5 検体と平成 15 年 12 月～平成 16 年 2 月まで計 4 回市場から生産者および産地のわかる地カキ 12 検体、ウバ貝(流通名バ貝) 12 検体購入し検体とした。これらの貝について、下痢症の原因となるノロウイルス、サポウイルスの検査を行った。検査法は、地カキおよびうば貝の 1 パック 1kg の剥き身から 4-5g

の中腸腺を分取し、 -80°C で凍結し、その後 55°C の $-\text{PBS}$ を7倍量加え軽くストマッカーし、 $3,000\text{rpm}$ で30分遠心後上清に 1.5N NaCl 、 $24\% \text{PEG}$ を乳剤の $1/2$ 量加え 4°C 一晩放置後 $10,000\text{rpm}$ で20分間遠心し、その沈さを 9ml の $-\text{PBS}$ に再浮遊させ、2本に分けた。この後は1検体2系列で検査を行った。2本に分けた後 5ml のバートレルXFを加え3分間ミキサーでよく攪拌し、 $2,500\text{rpm}$ 20分間遠心した。その上清を $10,000\text{rpm}$ 、 4°C 、60分間遠心し、その上清をさらに $35,000\text{rpm}$ 、 4°C 、3時間超遠心を行った。上清を除き沈さを $200\mu\text{l}$ のDNase, RNase Free 滅菌水を加え再浮遊これをRNA抽出用液とした。RNA抽出は、QIAamp Viral RNA mini Kitを用い、逆転写には、ランダムプライマー(6mer)を用い、SuperScript IIで 42°C 1時間反応させ、 $50\mu\text{l}$ のcDNAを作った。NV用プライマーは、1stG1にはCOG1F/G1-SKRを1stG2にはCOG2F/G2-SKRとALPF/G2AL-SKRを用いた。Nested PCRのプライマーは、G1は、G1-SKF/G1-SKRを、G2は、G2-SKF/G2-SKRおよびG2-SKF/G2AL-SKRを用いた。PCR条件は、1stは、 94°C 3分間1サイクル 94°C 1分、 50°C 1分、 72°C 2分を40サイクル、 72°C 15分を1サイクル行った。Nested PCRは、反応温度は同じで、40サイクル反応を35サイクル行った。

SV用プライマーは、国立感染症研究所下痢症ウイルスマニュアルの中のSV検査法に掲載されている配列を用いた。すなわち1stは、SV-F11/SV-R1、Nested PCRは、SV-F2/SV-R2で行った。反応時間は1stPCR、Nested PCRとも 96°C 3分1サイクル 96°C 30秒 46°C 45秒 72°C 60秒35サイクル 72°C 5分1サイクル反応させた。

一方熊本市域における人由来下痢症ウイルスは、平成15年12月～平成16年1月に採取された下痢症患者の便について検査を行った。検査法は、ロタ・アデノレックスドライによる迅速検査、電子顕微鏡法そして、NVのRT-PCR法を行った。便10%乳剤からのRNA抽出は、ISOGEN-LSを用いた。逆転写は、ランダムプライマー(6mer)を用い、SuperScript IIで $50\mu\text{l}$ のcDNAを作った。ノロウイルス用プライマーは、G1はG1-SKF/G1-SKR、G2はG2-SKF/G2-SKRおよびG2-SKF/G2AL-SKRを用いた。反応時間は、食品と同じように行った。

検出された目的バンドは、ダイレクトシーケンスを行った。実施した検体は1検体からG2-SKF/G2-SKRおよびG2-SKF/G2AL-SKRの2種類のプライマーペアでPCR産物が増幅された検体については両プライマー産物についてシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

検査対象の一つは食品であり、もう一つの対象は人由来の病原ウイルスの遺伝子情報のみであるため倫理面の問題が発生するとは考えられない。

C. 研究結果

地カキ17検体、ウバ貝12検体から、SVのRT-PCRの結果目的バンドは検出されなかった。NVは、平成15年2月の地カキ5検体中3検体からG1-SKF/G1-SKRプライマーで増幅したものから目的バンドが確認された。平成15年12月～平成16年2月までの検体のウバ貝12検体中4検体がRT-PCRでバンドが確認された。うち2検体はG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR、G2-SKF/G2AL-SKRプライマーで目的バンドが確認され、2検体はG2-SKF/G2-SKR、G2-SKF/G2AL-SKRでバンドが確認された。これら7検体G I 6株、G II 8株についてダイレクトシーケンスを行った。下痢症患者からのロタ・アデノドライ検査結果は不検出であり、EM法の結果とRT-PCRの結果はほぼ一致した。患者由来株は、G II 9株についてダイレクトシーケンスを行った。これらの結果について、分子系統樹を作製し、解析を行った。食品由来株G I /1が3株、G I /7が1株G I nagano/C2が1株、G I 不明が1株であった。G2は、G II /1が2株、G II /2が2株、G II /8が2株G II Korea/C12が2株であった。患者便由来株はG II /1が6株、G II /2が3株であった。この中で、同じ検体からG2-SKF/G2-SKRおよびG2-SKF/G2AL-SKRの2種類のプライマーで検出されている各7株は同じ型に分類された。

D. 考察

今回の調査ではSVは2枚貝からの検出はなかった。これは、市中ではNV感染者に比べてSV感染者が少なく、これを反映しているのではないかと考えられた。

一方NVは、今年度食中毒事例は熊本市での発生はなく、苦情事例が数件発生したのみであった。食中毒患者としては、長崎市で大規模な食中毒事

例があり、熊本市にも患者がいた。しかし、今回の報告には長崎市事例患者由来 NV は除いた。

今回の調査では、G1 は 2 枚貝から検出されたが、人の検体からは検出されなかった。貝からの検出があることから、患者もいるはずではあると考えられた。G II に関しては G II/1、2 型はヒト、貝ともに検出されたが、G II/8、G II korea/C12 はヒト検体からは検出されなかった。

今回分離されたような様々な遺伝子型の NV が市中で流行していると考えられた。しかし、ヒトから不検出の原因は、食中毒事例が少なくヒトの検査数が少なかったから検出されなかったのか、貝が多くタイプのウイルスを無条件に蓄積し、ヒトは感染による選択があるため、検出されなかったのかは不明である。ヒトの NV 感受性も含めて解析が必要なところである。調査を進めていけば、検出遺伝子型の違いも解明されるのではないかと考えられた。

E. 結論

今回の調査で 2 枚貝計 29 検体について NV、SV の検査を行った。その結果 SV は不検出であったが、NV は 7 検体から RT-PCR 法で検出することができた。その 7 検体 11 株について遺伝子解析をおこなった。また下痢症患者から検出された NV9 株についても遺伝子解析をおこなった。その結果、2 枚貝から検出された NV 遺伝子型 G I は、G I/1、G I/7、G I nagano/C2 および G I 型不明であった。G II は、G II/1、G II/2、G II/8 及び G II Korea/C12 であった。一方下痢症患者から検出された NV 遺伝子型は G II/1、G II/2 型であった。

2 枚貝と、下痢症患者からの検出は完全には一致せず、2 枚貝からの検出の方が遺伝子型のバリエーションがあった。食品検体と患者検体での検出 NV の遺伝子型が完全に一致しないのは、患者検体数が少ないことによる問題なのか人のウイルスに関する感受性の問題かは不明であった。しかし今後調査を続けていくことで、遺伝子型の検出パターンの違いは解明されると考えられた。

F. 健康危機情報

特に指定されているものについての情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

なし

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

食品由来のウイルス性感染症の検出法の高度化、実用化に関する研究

分担研究項目：食品由来ウイルス検出法の検討と評価

分担研究者 入谷展弘 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課 研究員
協力研究者 改田 厚 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課 研究員
久保英幸 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課 研究員
勢戸祥介 大阪市立大学大学院医学研究科 助手

研究要旨

大阪市で検出されたノロウイルス(NV)について、プローブ型別およびCapsid N/S領域の遺伝子型別を行った。平成 14 年度に大阪市で検出された NV 株は、P2B 型が主流であった。しかし、P2B 型には少なくとも 8 種類の遺伝子型が存在しており、特に 1 種類の遺伝子型が優勢になるような流行ではなく、様々な種類の遺伝子型が混在した流行であった。Capsid N/S 領域における遺伝子型別では、少なくとも 21 種類 (GI/7 種類、GII/14 種類) の遺伝子型に分類された。遺伝的多様性を示す NV 流行を詳細に解析していくためには遺伝子型別が有用であると考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) の検査や解析に分子生物学的手法が導入されて以来、NV の遺伝的多様性が明らかになってきている。我々は、これまで NV の分子疫学的解析に ORF1 の Polymerase 領域を対象としたプローブ型別法を用いてきた。しかし、既存のプローブ型では型別できない株やプローブ型と Capsid 領域の遺伝子型別による分類が一致しない株が存在するなど、詳細な NV の解析がプローブ型別では難しくなってきた。

今回、大阪市で検出された NV 株につ

いて、プローブ型別および Capsid 領域の遺伝子型別を行い、遺伝子型別による NV 流行解析の有用性について検討した。

B. 研究方法

1) 検査材料

2002 年 4 月から 2003 年 3 月 (平成 14 年度) に当研究所に検査依頼のあった非細菌性胃腸炎 40 事例の患者糞便 111 検体を用いた。また当研究所で過去に検出した NV 株の中で、遺伝子型の分類が不明確であった Genogroup I (GI) NV 1 株および Genogroup II (GII)

NV 6 株も用いた。

2) NV の検出

ウイルス RNA は、140 μ l の 10% 糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、キットの添付説明書にしたがって抽出した。RNA 抽出液は Random hexamer (Amersham) および逆転写酵素 AMV XL (Life Science) を用いて逆転写を行い cDNA を作製し、4 μ l を PCR に用いた。

NV の検出は、影山らのリアルタイム PCR 法 (JCM, 41, 1548-57, 2003) に従って行った。即ち、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) を用いて、GI の NV 検出にはプライマー COG1F/R および TaqMan プローブ RING1-TP (a) / (b) を、GII の NV 検出にはプライマー COG2F/R および TaqMan プローブ RING2-TP を用いて、GI・GII 別々に反応を行い、ABI PRISM7700 (ABI) で蛍光強度をリアルタイムに測定した。

3) NV の遺伝子型別

同じ事例で複数の NV 陽性検体があった場合は少なくとも 2 検体以上について、上記で作製した cDNA と Kojima ら (JVM, 100, 107-114, 2002) の Capsid N terminal/Shell domain (N/S) 領域を増幅するプライマー (GI 用: G1SKF/R, GII 用: G2SKF/R) を用いて PCR を行った。増幅された NV 遺伝子はダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー (ABI PRISM310, ABI) で塩基配列を決定した。プライマー G1SKF/R、G2SKF/R で増幅した共通領域である GI/290 塩基、GII/278 塩基を遺伝子型別の対象領域とした。NV の塩基配列は、

Clustal X (ver. 1.81, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>) を用いてアライメント (DNA weight matrix: Clustal W 1.6) した後、Kimura の 2 パラメーター法に基づいて遺伝的距離を計算した。NV の遺伝子型別は、Katayama らの分類 (病原微生物検出情報 24, 312-4, 2003) に基づいて、近隣接合 (Neighbor joining) 法により分子系統樹を作成して行った。分子系統樹の樹型はブートストラップを 1000 回行い検定した。

4) NV のプローブ型別

リアルタイム PCR によって NV 陽性となった全ての検体について、上記で作製した cDNA と Ando ら (JCM, 33, 64-71, 1995) の Polymerase 領域を増幅する SR 系プライマーで PCR を行い、サザンハイブリダイゼーション法で 6 種類のプローブ型 (GI:P1A, SOV, GII:P1B, P2A, P2B, 96065) に分類した (JCM, 38, 2649-54, 2000)。

C. 研究結果

表 1 に、平成 14 年度に NV 陽性となった非細菌性事例の概要および検査結果を示した。40 事例中 31 事例 (77.5%)、患者糞便材料 111 検体中 72 検体 (64.9%) から NV が検出された。推定原因別では、カキの喫食が疑われた事例が 17 事例 (54.8%) と最も多かった。

検出した NV のプローブ型は、P1A 型が 2 事例 (6.5%)、P1B 型が 2 事例 (6.5%)、P2B 型が 13 事例 (41.9%)、複数のプローブ型が混在していた事例が 9 事例 (29.0%) であった (図 1)。複数のプローブ型が混在していた 9 事例のうち

8 事例には P2B 型の NV が含まれており、平成 14 年度は P2B 型の NV による事例が 21 事例 (67.7%) となった。リアルタイム PCR 法のみで陽性であった検体については、6 つのプロープ型に分類できないため GI または GII と示した (表 1)。

系統解析の結果、今回遺伝子型別した NV 株には、少なくとも 21 種類 (GI:7 種類、GII:14 種類) 存在することが確認され、Katayama らによって示された 31 種類の遺伝子型 (GI:14 種類、GII:17 種類) のいずれかに分類された (図 2)。分子系統樹上で遺伝子型を形成するクラスターは、GI/9 (Desert Shield) を除いて、ブートストラップ値が 981 以上であり、統計的にも支持されていた。また塩基配列の相同性においても、GI/9 を除いた同じ遺伝子型内では 90% 以上の相同性を示した。

平成 14 年度に検出された NV の遺伝子型は、GI に属する事例が GI/8 (Winchester) 2 事例、GI/5 (SzUG1) 1 事例、GI/7 (Chiba) 1 事例であり、GII に属する事例が GII/5 (Hillingdon) 5 事例、GII/2 (Toronto) 3 事例、GII/8 (Seacroft) 3 事例、GII/1 (Bristol) 2 事例、GII/10 (Amsterdam) 2 事例、GII/15 (KU82GII) 2 事例、GII/6 (Chitta) 1 事例であり、複数の遺伝子型が混在していた事例が 9 事例であった。複数の遺伝子型が混在していた 9 事例中、4 事例に GI/8、5 事例に GII/5 が含まれており、GI では GI/8 (6 事例、19.4%)、GII では GII/5 (10 事例、32.3%) がそれぞれ最も多く検出された遺伝子型であった。GII/5 の NV が検出された 10 事例のうち 9 事例はカキの喫食が疑

われた事例であった。

プロープ型と遺伝子型の関係を見ると P1A 型には 4 種類、SOV 型には 1 種類、P1B 型には 2 種類、P2A 型には 1 種類、P2B 型には 9 種類、96065 型には 1 種類の遺伝子型が存在していた (表 2)。また 6 種類のプロープに反応しない遺伝子型も 4 種類 (GI:2 種類、GII:2 種類) 存在することが確認された。また平成 14 年度に大阪市で主流であった P2B 型には 8 種類の遺伝子型が存在していた。

D. 考察

遺伝子型別による NV 解析は、これまで多くの研究グループから報告されてきた。最近、Ando ら (*JID*, suppl2, 181, 336-348, 2000)、Vinje ら (*Arch. Virol.*, 145, 223-241, 2000) および Katayama ら (*Virology*, 299, 225-239, 2002) は、Capsid 蛋白質の N 末端側をコードする領域での分類・型別を報告している。これらの報告から、Capsid 蛋白質の N 末端側をコードする領域における NV の分類の信頼性は高いと考えられる。また Katayama らによって分類された遺伝子型と抗原性の関係においては、名取ら (*日本臨床*, 60, 1194-1195, 2002) によって異なる遺伝子型は互いに異なる抗原性を示すことが報告されており、Capsid 蛋白質の N 末端側をコードする領域における NV の分類は NV 流行解析に非常に有用であると考えられた。

今回、我々の行った遺伝子型別により、大阪市で検出された NV 株は 21 種類の遺伝子型に分類され、1 年間で少なくとも 15 種類の遺伝子型の NV が流

行していたことが明らかとなった。また一つのプローブ型に 1~9 種類の遺伝子型が存在することが示され、平成 14 年度に大阪市で主流であった P2B 型には 8 種類の遺伝子型が確認された。遺伝子型別による NV 流行解析の結果、平成 14 年度は、GII/5 が最も多く、次いで GI/8 が多かったが、特に 1 種類の遺伝子型が優勢となるような流行でなく、様々な種類の遺伝子型の NV が混在した流行であることが判明した。カキの喫食が疑われた事例の中では 17 事例中 9 事例 (52.9%) から GII/5 の NV が検出されており、平成 14 年度のシーズンにおいてカキと GII/5 の NV が特に関連していた事が示唆された。GII/2 に分類される Toronto 株は、P2A 型に分類されるが、平成 14 年度に検出した GII/2 に分類される NV はすべて P2B 型に分類された。これらの NV 株は、Bristol/Lordsdale 類似株 (P2B) と Toronto/Mexico 類似株 (P2A) のリコンビナントウイルスであると考えられている Arg320 株と類似したウイルスであると考えられた。このように遺伝的多様性を示す NV 流行を詳細に解析していくためには、遺伝子型別による解析が必要であると考えられた。

E. 結論

- ・ 大阪市で検出された NV 株は Capsid N/S 領域の遺伝子型別において、21 種類 (GI:7 種類、GII:14 種類) の遺伝子型に分類された。
- ・ 平成 14 年度の大阪市では、主流であった P2B 型の NV には少なくとも 8 種類の遺伝子型が存在しており、特

に 1 種類の遺伝子型が優勢となるような流行でなく、様々な種類の遺伝子型の NV が混在した流行であった。

- ・ 遺伝的多様性を示す NV 流行を解析していくためには、Capsid N/S 領域における遺伝子型別が有用であると考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

○Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of norwalk-like virus Infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1756-1759 (2003)

○入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾 治、武田直和、村上 司、簗城昇次、改田 厚、綾田 稔、小倉 壽:平成 14 年度に大阪市で検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別、大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報、65、29-37 (2003)

○勢戸祥介、入谷展弘、小倉 壽:ウイルスによる食中毒、*医薬ジャーナル*、39、1457-1461 (2003)

○入谷展弘、勢戸祥介:ノロウイルス感染症、*生活衛生*、47、344-349 (2003)

2) 学会発表

○勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、春木孝祐、名取克郎、武田直和、綾田

稔、小倉 壽：Alphatron type NVについて、衛生微生物技術協議会第 24 回研究会 (2003. 7)

○入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾 治、武田直和、村上 司、簗城昇次、改田 厚、綾田 稔、小倉 壽：平成 14 年度に検出された Norwalk virus のプローブ型別および遺伝子型別、平成 15 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会 (2003. 9)

○入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、村上 司、改田 厚、綾田

稔、小倉 壽：小児急性胃腸炎患者から検出されたノーウォークウイルスの分子疫学的解析、第 51 回日本ウイルス学会 (2003. 10)

○勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田 厚、春木孝祐、西尾 治、綾田 稔、小倉 壽：平成 14 年度に大阪市で検出された Norwalk virus の遺伝子型別、第 51 回日本ウイルス学会 (2003. 10)